

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2001-512304  
(P2001-512304A)

(43)公表日 平成13年8月21日 (2001.8.21)

(51)Int.Cl.

C 12 N 5/06

識別記号

F I

C 12 N 5/00

マーク (参考)

E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁)

(21)出願番号 特願平10-528120  
(86) (22)出願日 平成9年12月5日(1997.12.5)  
(85)翻訳文提出日 平成11年6月7日(1999.6.7)  
(86)国際出願番号 PCT/US97/22022  
(87)国際公開番号 WO98/32333  
(87)国際公開日 平成10年7月30日(1998.7.30)  
(31)優先権主張番号 60/035,274  
(32)優先日 平成8年12月6日(1996.12.6)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71)出願人 オシリス セラピューティクス, インコ-  
ボレイテッド  
アメリカ合衆国, 21231-2001 メリーラ-  
ンド, ボルチモア, アリスアンナ ストリ-  
ート 2001  
(72)発明者 ピッテンジャー, マーク, エフ.  
アメリカ合衆国, 21146 メリーランド,  
セバーナ パーク, サウスウェイ 108  
(72)発明者 マッケイ, アラステア, エム.  
アメリカ合衆国, 21093 メリーランド,  
ティモニウム, #203 バトリック コー-  
ト 4  
(74)代理人 弁理士 丹羽 宏之

最終頁に統く

(54)【発明の名称】ヒト間葉幹細胞の改良された軟骨形成分化

(57)【要約】

開示されるのは、間葉始原細胞の高められた試験管内軟骨形成を支持する高められた水準の単糖類を持つ合成成分の組成物、そのような始原細胞の試験管内軟骨形成誘導のための方法、およびそのような始原細胞から試験管内でヒト軟骨を形成する方法、である。

## 【特許請求の範囲】

1. ヒト間葉前駆細胞の試験管内軟骨形成およびそれからヒト軟骨細胞の試験管内形成のための一つの組成物であって、この組成物が三次元形態での分離ヒト間葉幹細胞およびそれと接触する少くとも1個の軟骨誘導剤を含むことを特徴とする組成物。
2. 請求の範囲第1項に記載の組成物であって、ここで間葉幹細胞が分離され培養拡張されたヒト間葉幹細胞であることを特徴とする組成物。
3. 請求の範囲第1項に記載の組成物であって、ここで間葉幹細胞が合成無血清環境にあることを特徴とする組成物。
4. 請求の範囲第1項に記載の組成物であって、ここで間葉幹細胞が近接するよう濃縮されることを特徴とする組成物。
5. 請求の範囲第4項に記載の組成物であって、ここで間葉幹細胞がパック細胞あるいは遠心細胞ペレットとして存在すること特徴とする組成物。
6. 請求の範囲第1項に記載の組成物であって、ここで軟骨誘導剤が(i)グルココルチコイド、(ii)トランスフォーミング成長因子- $\beta$ 上科メンバー、(ii)I)コラーゲン細胞外基質の成分、および(iv)ビタミンA類似体よりなるグループから選択されることを特徴とする組成物。
7. 請求の範囲第6項に記載の軟骨誘導剤であって、ここでグルココルチコイドがデキサメタゾンであることを特徴とする軟骨誘導剤。
8. 請求の範囲第6項に記載の軟骨誘導剤であって、ここでトランスフォーミング成長因子- $\beta$ 上科のメンバーが骨形態形成タンパク質(望ましくはBMP-4)、TGF- $\beta$ 1、インヒビンAあるいは軟骨形成刺激活性因子であることを特徴とする軟骨誘導剤。
9. 請求の範囲第8項に記載の軟骨誘導剤であって、ここで骨形態形成タンパク質がBMP-4であることを特徴とする軟骨誘導剤。
10. 請求の範囲第6項に記載の軟骨誘導剤であって、ここでコラーゲン細胞外基質の成分がI型コラーゲンであることを特徴とする軟骨誘導剤。
11. 請求の範囲第10項に記載の軟骨誘導剤であって、ここでI型コラーゲン

がゲル形態にあることを特徴とする軟骨誘導剤。

12. 請求の範囲第6項に記載の軟骨誘導剤であって、ここでビタミンA類似体がレチノイン酸であることを特徴とする軟骨誘導剤。

13. 請求の範囲第1項に記載の組成物であって、ここで軟骨誘導剤がデキサメタゾンとTGF- $\beta$ 1の組合せであることを特徴とする軟骨誘導剤。

14. 間葉幹細胞が三次元形態に会合し間葉幹細胞を試験管内で軟骨誘導剤と接触させることにより間葉幹細胞から軟骨細胞を生産する一つのプロセス。

15. 請求の範囲第14項に記載のプロセスであって、ここで間葉幹細胞が分離され培養拡張されたヒト間葉幹細胞であることを特徴とするプロセス。

16. 請求の範囲第14項に記載のプロセスであって、ここで間葉幹細胞が合成無血清環境にあることを特徴とするプロセス。

17. 請求の範囲第14項に記載のプロセスであって、ここで間葉幹細胞が近接するよう濃縮されることを特徴とするプロセス。

18. 請求の範囲第17項に記載のプロセスであって、ここで間葉幹細胞がパック細胞あるいは遠心細胞ペレットとして存在することを特徴とするプロセス。

19. 請求の範囲第14項に記載のプロセスであって、ここで軟骨誘導剤が(i)グルココルチコイド、(ii)トランスフォーミング成長因子- $\beta$ 上科のメンバー、(iii)コラーゲン細胞外基質の成分、および(iv)ビタミンA類似体となるグループから選択されることを特徴とするプロセス。

20. 請求の範囲第14項に記載のプロセスであって、ここで軟骨誘導剤がデキサメタゾンとTGF- $\beta$ 1の組合せであることを特徴とするプロセス。

21. 請求の範囲第14項に記載のプロセスであって、ここで接触の段階がヒト間葉幹細胞のペレットを合成無血清培地で培養することを含むことを特徴とするプロセス。

22. 請求の範囲第21項に記載のプロセスであって、ここで合成無血清培地が(1)合成最小必須培地、(2)アスコルビン酸塩あるいはその類似体、(3)鉄源、(4)インスリンあるいはインスリン状成長因子、および(5)少くとも1個の軟骨誘導剤あるいは因子、を含むことを特徴とするプロセス。

23. 請求の範囲第14項に記載の方法であって、ここで細胞が軟骨誘導組成物で培養されその後硬質多孔容器に置かれることを特徴とする方法。

24. 請求の範囲第23項に記載の方法であって、ここで硬質多孔容器がセラミックキューブであることを特徴とする方法。

25. 間葉幹細胞が三次元形態に会合し間葉幹細胞を試験管内で軟骨誘導剤と接触させることにより間葉幹細胞に軟骨形成を誘導する一つのプロセス。

26. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで間葉幹細胞が分離され培養拡張されたヒト間葉幹細胞であることを特徴とするプロセス。

27. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで間葉幹細胞が合成無血清環境にあることを特徴とするプロセス。

28. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで間葉幹細胞が近接するよう濃縮されることを特徴とするプロセス。

29. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで間葉幹細胞がパック細胞あるいは遠心細胞ペレットとして存在することを特徴とするプロセス。

30. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで軟骨誘導剤が(i)グルココルチコイド、(ii)トランスフォーミング成長因子- $\beta$ 上科のメンバー、(iii)コラーゲン細胞外基質の成分、および(iv)ビタミンA類似体となるグループから選択されることを特徴とするプロセス。

31. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで軟骨誘導剤がデキサメタゾンとTGF- $\beta$ 1の組合せであることを特徴とするプロセス。

32. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで接触の段階がヒト間葉幹細胞のペレットを合成無血清培地で培養することを含むことを特徴とするプロセス。

33. 請求の範囲第32項に記載のプロセスであって、ここで合成無血清培地が(1)合成最小必須培地、(2)アスコルビン酸塩あるいはその類似体、(3)鉄源、(4)インスリンあるいはインスリン状成長因子、および(5)少くとも1個の軟骨誘導剤あるいは因子、を含むことを特徴とするプロセス。

34. 請求の範囲第25項に記載の方法であって、ここで細胞が軟骨誘導組成物

で培養されその後硬質多孔容器に置かれることを特徴とする方法。

35. 請求の範囲第34項に記載の方法であって、ここで硬質多孔容器がセラミックキューブであることを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## ヒト間葉幹細胞の改良された軟骨形成分化

この発明は試験管内で培養された間葉始原細胞を特異的細胞系列経路に分化するように指向するための方法および組成物の分野に関し、とりわけヒトおよび他の種で病的状態の治療処置のための受容体あるいは宿主へのこれらの細胞の移植に先立つ、あるいはその移植の時点でそのような指向系列誘導に関する。

間葉幹細胞 (M S C<sub>s</sub>) は脂肪、骨、軟骨、弾性、筋および線維などの結合組織を含む特殊な型の間葉あるいは結合組織に分化することができる骨髄、血液、真皮、および骨膜に見出される形成多能芽細胞あるいは胚状細胞である。これらの細胞が入る特異的分化経路は機械的影響およびもしくは成長因子、サイトカインなどの内因性生物活性因子、およびもしくは宿主組織により確立された局所微環境条件からの各種の影響に依存する。これらの細胞は通常骨髄で非常に低い頻度で存在するけれども、組織培養でこれらの細胞の集団を分離し、精製し、また有糸分裂拡張するプロセスは、キャプラン他、合衆国特許第5, 197, 985号、第5, 226, 914号、および第5, 486, 359号、間葉幹細胞、整形外科研究ジャーナル、9巻：641-650ページ、1991年で報告されている。

出生前生体では、M S C<sub>s</sub>の特殊化結合組織細胞への分化は十分に確証されている。例えば胚ひな、マウスあるいはヒト肢

芽間葉細胞は軟骨、骨および他の結合組織に分化する (キャプラン A I, 間葉幹細胞。整形外科研究ジャーナル9巻：641-650ページ、1991年。発達生物学協会39回年次シンポジウム、S サブテルニーおよびU アボット編、3768ページ。ニューヨーク、アラン R リス インコーポレイテッド、1981年、所収；エルマー他、奇形学、24巻：215-223ページ、1981年；ハウシュカ S D, 発達生物学、37巻：345-368ページ、1974年；サラーシュ他、発達生物学、83巻、9-19ページ、1981年；スウォラ他、発達生物学、116巻：31-38ページ、1986年)。加えて、クローンラット胎仔頭蓋冠細胞系も筋、脂肪、軟骨、および骨に分化することが

示されている（五島他、臨床整形外科関連研究、269巻：274-283ページ、1991年）。出生後生体でのM S C<sub>s</sub>の存在は、後胚細胞のいくつかの中胚葉表現型への分化を示す目的では広く研究されてはこなかった。行われた数少ない研究は骨髓細胞の拡散チャンバーへの入れこおよび生体内移植に続く骨髓細胞による骨および軟骨の形成を伴う（アシュトン他、臨床整形外科研究、151巻：294-307ページ、1980年；ブルーダー他、骨無機物、11巻：141-151、1990年）。最近、ひな骨膜からの細胞が分離され、培養で拡張され、また試験管内で高密度条件の下で軟骨および骨に分化することを示した（中原他、実験細胞研究、195巻：492-503ページ、1991年）。ラット骨髓誘導間葉細胞は生体内で移植された時、骨芽細胞および軟骨細胞に分化する能力を持つことを示した（デ

ニス他、細胞移植、1巻：2332ページ、1991年；五島他、臨床整形外科関連研究、269巻：274-283ページ、1991年）。培養での軟骨細胞の表現型が解糖およびクエン酸サイクルに利用できる糖類の濃度により影響されることが報告された（P. オット、「関節軟骨の基本細胞代謝、マノメーターによる研究」リューマチ学ジャーナル、50巻：304-12ページ、1991年；およびJ. M. レーン、C. T. ブライトン、ならびにP. J. メンコヴィッチ、「関節軟骨における嫌気性および好気性代謝」リューマチ学ジャーナル、4巻：334-42ページ、1977年）。

最近のものではジョンストン他（整形外科研究協会会報、42巻：65ページ、1996年）骨髓誘導間葉細胞の試験管内軟骨形成。整形外科研究協会会報21巻：65ページ、1996年はラビットM S C<sub>s</sub>が試験管内で軟骨状表現型を発達させる培養条件を記述している。細胞は血清なしであるが、デキサメタゾン、ITS、およびアスコルビン酸-リノ酸塩の存在下で最小培養条件で成長する。細胞が低速で回転されると、それは層を形成しその層は1-2日間ではっきりとしないペレットに発達した。数週の間に、細胞はヒト細胞で使用される最初の観察対象であるII型コラーゲンの合成を開始し分泌するであろう。

滑膜関節の関節面への損傷は、外傷から、変形性関節症などの疾患から、また

老齢化の結果として起こり得る。損傷関節の社会的経済的コストは大きく、また関節機能を回復できる有効な治療法が歓迎されるであろう。関節軟骨は関節軟骨細胞に分

化した間葉細胞による出生前および出生後の成長の間に創り出され維持される。個体は成熟するにつれて主要な滑膜欠損を修復する能力を失うが、何故ならそれらの関節は関節軟骨を再生する適切に分化した細胞の十分な数を欠くためである。かくして損傷関節面が適切な細胞外基質を再構築するとみられる自己由来細胞を移植することにより損傷関節面が修復されるという仮説に多くの関心がこれまで寄せられてきた。培養軟骨細胞を膝に導入することに伴う一つの研究が非常に有望であるものとして現れた。最近のエッセーで整形外科医ジョーゼフ・バックウォルターが指摘しているように、これおよび類似の努力が不確かな長期にわたる成功と出会っている（J. A. バックウォルター、「関節軟骨の再生：何故突然関心を呼んだのか？」今日の整形外科学、1996年4月12日）。

かくして、軟骨再生治療に関して絶えざる必要性と機会が存在する。

#### 発明の概要

今まで、大量のhMSCsの均一に軟骨細胞系列への投入を起こさせることは可能ではなかった。ここで記載される組成物はこの目標を達成する。かくして、この発明は一つの技術の発展、つまり広範囲に及びまたかなりの潜在的有用性を持つ関節軟骨の自己由来MSCsベース修復において、一つの重要な段階を体現する。

この発明に従って、発明者により観察されてきたものは、ヒト間葉幹細胞（hMSCs）であり、クエン酸サイクルによりATPの生産に寄与する単糖類あるいは他の因子の上昇した水

準を持つある種の軟骨誘導培地組成物と試験管内で接触させると、hMSCsは生活力を維持しまた著しく改良された投入および分化に誘導され得ることであった。望ましい実施例において、hMSCsは三次元形態、例えば細胞ペレットなどに会合する。三次元形態はこの発明の試験管内軟骨形成に寄与し、また細胞は

望ましくは、例えばパックされあるいはペレット化された細胞塊として一緒に濃縮される。この試験管内プロセスは試験管内で起こるものを反復するものと考えられ、また軟骨形成プロセスで重要である分子事象を定義するために使用することができる。

かくして一つの見地において、この発明はヒト間葉前駆細胞の試験管内軟骨形成およびそれからのヒト軟骨細胞の試験管内形成のための一つの組成物を提供し、この組成物は（選択肢として三次元形態での）分離ヒト間葉幹細胞および、そこで接触する少くとも約3 g／リットル（g／l）から、望ましくは約3 g／l乃至約7 g／lの単糖類濃度を持つ培地での少くとも1個の軟骨誘導剤を含む。間葉幹細胞は望ましくは合成無血清環境で分離され培養拡張されたヒト間葉幹細胞であり、三次元細胞塊、例えばパック細胞あるいは遠心細胞ペレットの形態で密に近接するように凝縮することができる。

この発明のも一つの見地において、TGF- $\beta$  3がこれまでに使用されたもの、例えば(i) デキサメタゾンなどのグルココルチコイド、(ii) 骨形態形成タンパク質（望ましくはBMP-2あるいはBMP-4）、TGF- $\beta$  1、インヒビンAあるいは軟骨形成刺激活性因子などの形質転換成長因子- $\beta$  上科

の他のメンバー、(iii) I型コラーゲンなどのコラーゲン細胞外基質の成分、あるいは(iv) レチノイン酸などのビタミンA類似体、などよりももっと有効な軟骨誘導剤である。TGF- $\beta$  3はMSCsの分化を支配的に軟骨細胞に誘導するのに有効な量で培地に含まれる。このような濃度は少くとも約5 ng／mlの培地であり、望ましくは5-15 ng／mlの培地である。

この発明はまた間葉幹細胞を前に記載の改良培地、とりわけ軟骨形成功能を誘導するのにこれまでに使用されたもの以上の高いグルコースあるいはラクトース濃度を持つ培地に試験管内で軟骨誘導剤と接触させることにより間葉幹細胞から軟骨細胞を生産するプロセスを提供する。

この発明は更に間葉幹細胞を試験管内でこの発明の組成物と接触させることにより間葉幹細胞に軟骨形成を誘導するプロセスを提供する。

更にここで開示されるのは、hMSCs誘導軟骨細胞の肥大型軟骨細胞への更

なる分化と成熟を可能にし促進する試験管内培養条件である。これはとりわけ (i) 軟骨細胞成熟に伴う因子の研究、(ii) 軟骨形成時に生じる遺伝子発現の変性の研究、(iii) 成熟軟骨細胞により生産される因子の同定および研究、(iv) 薬理物質の成熟軟骨細胞に対する作用の評価、(v) 变形性関節症などの関節疾病に共通の成熟軟骨細胞の基質-金属プロテイナーゼおよび他の分解性酵素への罹病性の決定、および(vi) 関節疾病を改善する目的で hMSCs に導入された遺伝子の発現の研究、などにとって有用である。

肥大性分化を受ける hMSCs の能力は移植 hMSCs による関節軟骨の全厚欠損部の修復に直接関連している。移植片は隣接する組織によりよく「固着」され、また肥大性軟骨、無機質化軟骨および骨が欠損部の深層域で移植材料を置換した時には修復はより永続的にされる。ここで提示された試験管内結果は、そのような置換が実行可能な臨床選択肢であるということの重要な徴候である。かくしてこの発明のこの見地の部分は、表現型が顕著となり軟骨芽細胞段階を越えた細胞の成熟を示すので、特異的表現型を促進する条件を確認することで軟骨分化プロセスを調節する、すなわち細胞を肥大性軟骨細胞に指向することにあった。

前記の方法では、間葉幹細胞は望ましくは合成無血清環境で分離され培養拡張されたヒト間葉幹細胞であり、三次元細胞塊、例えばパック細胞あるいは遠心細胞ペレットの形態で密に近接するように凝縮される。更に、接触はヒト間葉前駆細胞を合成無血清培地で培養することを含み、この培地は(1) 合成最小必須培地、(2) アスコルビン酸塩あるいはその類似体、(3) 鉄源、(4) インスリンあるいはインスリン状成長因子、および(5) 少くとも1個の軟骨誘導剤あるいは因子を含む。前記の方法は更に望ましくは細胞が軟骨誘導組成物で培養されまたその後硬質多孔容器例えばセラミックキューブなどに置かれる段階を含む。

分離された非培養非相同ヒト間葉幹細胞調製物をこの発明の組成物および方法に使用することも可能である。MSCs は骨髄、血液(末梢血を含む)、骨膜および真皮、ならびに中胚葉

起源を持つ他の組織などから密度勾配分画などにより非培養非相同調製物として

分離することができる。これに関して、これらの間葉幹細胞が非常に微量で例えれば骨髄に存在し、またこれらの量が（例えれば比較的若い患者で約1/10,000細胞から、年配の患者で1/2,000,000細胞まで少なくなるように）年齢と共に大幅に減少するけれども、ヒト間葉幹細胞調製物は組織、とりわけ骨髄から分離することができ、骨髄にある他の型の細胞から事実上遊離していることが発見された。分離された分画調製物は細胞の少くとも約90%、また望ましくは少くとも約95%がヒト間葉幹細胞の細胞を含むであろうということが考えられる。

更に開示されているのは、hMSC誘導軟骨細胞の肥大性軟骨細胞への更なる分化および成熟を可能にし促進する試験管内培養条件である。これは軟骨細胞の成熟に伴う因子の研究、軟骨形成の間に生じる遺伝子発現の変更の研究、軟骨細胞の成熟により生じる因子の同定および研究、軟骨細胞の成熟に対する薬理物質の作用の評価、変形性関節症などの関節疾病に共通の成熟軟骨細胞の基質-金属プロテイナーゼおよび他の分解性酵素への感受性の決定、関節疾病を改善する目的でhMSCsに導入された遺伝子の発現の研究に有用であることを立証する。

前記の試験管内方法で軟骨形成の導入および軟骨細胞の生産で生じる事象の連続は胚形成における軟骨形成の連続と類似する。システムのすべての成分が定義されているために、このシステムは成長因子などの軟骨形成の進行への作用についての研究のための価値ある研究手段として使用することができる。

更にそれは始原細胞からの哺乳類軟骨形成の分子制御の研究に適用することができる。

#### 図面の簡単な説明

この発明は各図面の簡単な説明を引用することによりこれから更に説明されるが、それはこの発明の範囲を制約するものでは決してない。

図1. hMSCsのサイズの変化が細胞外基質成分の合成の範囲を反映する。各ペレットは200,000細胞のアリコートを1g/l (5.5mM) のグルコース（左側あるいは4.5g/l (25mM) のグルコース（右側）を持つ1/2mlの軟骨形成培地に移すことにより形成された。

図2 A. 1 g / 1 グルコースを持つ軟骨形成培地で 1 週間培養後成長した h M S C ベレットの  $8 \mu m$  切片。切片は II 型コラーゲンの存在のために免疫染色され展開されたが、図2 B で示されるように高グルコースで成長したベレットに見られる褐色反応製品を明らかにしなかった。切片は同じくヘマトキシリンでも染色された。倍率、125 X。

図2 B. 4. 5 g / 1 グルコースを持つ軟骨形成培地で 1 週間培養後、成長した h M S C ベレットの  $8 \mu m$  切片。切片は II 型コラーゲンの存在のために免疫染色され、褐色反応製品を明らかにするために展開されたが、それは高グルコースで成長したベレットのみに見られた。切片はまたヘマトキシリンで染色された。倍率、125 X。

図3 A. 低グルコース培地で 2 週間成長した h M S C ベレットの薄層切片。免疫染色は低グルコース条件でのベレットが図

3 B で示される高グルコース条件でのベレットよりも II 型コラーゲンの累積が少なかったことを示す。倍率、125 X。

図3 B. 高グルコース培地で 2 週間成長した h M S C ベレットの薄層切片。免疫染色は高グルコース条件でのベレットが図3 A で示される低グルコース条件でのベレットよりも II 型コラーゲンの累積が多かったことを示す。倍率、125 X。

図4 A. トライジンブルー O で成長の 3 週間後に染色された h M S C ベレットの薄層切片。軟骨細胞外基質の紫色「異染」染色特性は図4 B で示される高グルコースベレットの場合よりも際立ってはいない。倍率、125 X。

図4 B. トライジンブルー O で成長の 3 週間後に染色された h M S C ベレットの薄層断片。軟骨細胞外基質の紫色「異染」染色特性は図4 A で示される低グルコースベレットの場合よりも際立っている。倍率、125 X。

図5 A. 21 日目の h M S C ベレットの生活力染色。培養ベレットは  $2 \mu M$  のエチジウムホモ二量体染料で 72 時間保温され、次いで固定され、切開され、また第 2 染料、D A P I で事後染色された。非生活細胞の核はエチジウムホモ二量体をとり込み、従って赤色蛍光発光する。生活細胞は固定および切開の後とり込

またD A P I で青色蛍光発光する。細胞死滅はここで見られるように低グルコースペレットの際立った特徴である。倍率、125X。

図5 B. 21日目のh M S Cペレットの生活力染色。培養ペレットは2  $\mu$  Mのエチジウムホモ二量体染料で72時間保温され、次いで固定され、切開され、また第2染料、D A P I で事

後染色された。非生活細胞の核はエチジウムホモ二量体をとり込み、従って赤色蛍光発光する。生活細胞は固定および切開の後とり込まれたD A P I で青色蛍光発光する。細胞死滅は低グルコースペレットの際立った特徴であり、図5 A と比較して高グルコース条件での培養により大きく減少する。倍率、125X。

図6は肥大性形態を持つ細胞の領域に含まれる軟骨形成培養で実施例4で説明されたように調製されたh M S C<sub>s</sub>のペレットであることを示す。かくしてh M S C<sub>s</sub>は軟骨形成分化の培養条件の下で肥大を受けることができる。示されているように、h M S Cペレットは培養21日後に不完全な軟骨形成分化を受けた。高グルコースD M E Mは記述されているようにT G F -  $\beta$  3、デキサメタゾンおよび他の作用薬を補充された。切片はII型コラーゲンのために免疫染色された。不完全な褐色染色は、ペレットの部分のみが軟骨のこのマーカーを分泌した細胞を含んでいたことを示した。しかしこのII型コラーゲン正領域は大型裂孔内に細胞を含んでいた。このような形態はペレット培養内のh M S C<sub>s</sub>が肥大性分化を受けることができることを示唆している。最終倍率、150X。

図7 A および7 Bもまた図6で示されたものよりもずっと大きい肥大を示した細胞のペレットを示す。これらの図は2個の培地でのペレット培養でのh M S C<sub>s</sub>の連続処置が肥大性を誘導することを示す。軟骨形成培地での培養の14日後、図7 A のペレットはT G F -  $\beta$  3を欠いており、またデキサメタゾン10<sup>-9</sup> M、チロキシン50 nM、および $\beta$  リン酸グリセロール

20 mMを含む培地に切替えられた。図7 Bのペレットはもとの培地でそのままであった。28日に、両方のペレットは収穫され、切開され、II型コラーゲンに対する抗体で染色された。II型コラーゲンは両方のペレットで際立っている。図

7 A のペレットの拡張裂孔内での広大な数の細胞は、 h M S C<sub>s</sub> の肥大性分化がこの2段階培養養生法で顕著な経路であったことを示していた。これとは逆に、図 7 B のペレットは肥大性軟骨細胞が相対的に少なかった。最終倍率、 60 X。

#### 望ましい実施例の詳細な説明

この発明はこれからそれを支持する多くの実施例および例と関連してより詳細に説明されるであろう。

間葉幹細胞 (M S C<sub>s</sub>) は骨髓、血液、真皮および骨膜で見出され、また脂肪、骨、軟骨、弾性、筋、および線維の各結合組織を含む特異な型の間葉あるいは結合組織に分化することのできる形成多能芽細胞あるいは胚状細胞である。これらの細胞が入る特異な分化経路は、機械的な影響およびもしくは成長因子、サイトカインなどのような内因性生物活性因子、およびもしくは宿主組織により確立された局所性微環境条件からの各種影響に依存する。これらの細胞は通常骨髓に非常に低い頻度で存在するけれども、組織培養でこれらの細胞の集団を分離し、精製し、また有糸分裂拡張させるプロセスはキャプラン他、合衆国特許番号第5,197,985号、第5,226,914号、および第5,486,359号、間葉幹細胞、整形外科研究ジャーナル9巻、641-650ページ、1991年で報告されている。

ヒト間葉幹細胞は多数の型の間葉細胞、とりわけ軟骨を生産することができる。この形質は、2個の他のものと共にこれらの細胞を関節面の修復のための自己由来細胞治療に使用するための魅力的な候補者にさせる。第一に、ヒト間葉幹細胞が骨髓吸引液から得られるという相対的な安心感がある。第二に、これらの細胞は培養で数千倍もの拡張を受ける能力を示した (S. P. ブルーダー、N. ジェイズウォール、および S. E. ヘインズワース。「広範な継代培養および続く冷凍保存の間の精製ヒト間葉幹細胞の成長運動、自己再生および骨形成能」細胞生化学ジャーナル、1996年、印刷中)。

ここで説明されるのは、試験管内で一次および継代ヒト間葉幹細胞 (h M S C<sub>s</sub>) の軟骨形分化を誘導するのに使用されるこれまでの方法以上の改良である。この改良は培養軟骨細胞の再分化を促進するために発展された「ペレット培養

」組織培養プロトコルで構築する (W. 加藤、M. 岩本、T. 小池、F. 鈴木、  
およびY. 高野、「遠心管で成長するラビット軟骨細胞培養の端部分化および石  
灰化：トランスフォーミング成長因子 $\beta$ および血清因子による調節」全米科学ア  
カデミー紀要、85巻、9552-56ページ、1988年；R. T. バロック  
およびA. H. レッディ、「チロキシンは合成培地での分離軟骨細胞から得た柱  
状軟骨細胞の形態形成を調節する血清因子である」細胞生物学ジャーナル、12  
6巻：1311-18ページ、1994年；およびC. スー、B. O. オヤジョ  
ーバイ、A. フレーザー、L. D. コザーチ、R. G. G. ラッセル、およびA  
P. ホランダー、「ウシ鼻および関節軟骨細胞

ペレット培養でのプロテオグリカンおよびII型コラーゲン代謝回転に対する成長因子およびインターロイキン-1 $\alpha$ の作用」内分泌学、137巻：3557-65ページ、1996年）。我々はまた我々の培養法の効用を証明する細胞生活力を評価する検定法も説明する。これらの改良は新規な治療薬剤使用法に関連する遺伝子の同定を含むhMSCsの分化に関連した更なる発見を可能にする。

ここで報告された実験において、「高グルコースDMEM」(4.5 g/1.25 mM)に存在する量に対して「低グルコースDMEM」(1 g/1.5 mM)に存在する標準濃度から軟骨形成培地のグルコース濃度を増加すると、培養MSCsの分化を劇的に変えることを示す。軟骨形成に関する他の糖類の高濃度の作用も調査された。フルクトース3.5 g/1あるいはグルコース6 g/1の低グルコース培地への補充は高グルコース培地(4.5 g/1.グルコース)でそうであったように試験管内軟骨形成分化に同じ改良をもたらす。

この発明は多くの用途と利点を持つ。このような利点の一つは自己由来宿主への戻し移植に先立ち、MSC分化を指向し加速する能力にある。例えば、軟骨形成細胞になるように試験管内で指向されるMSCは、まず系列内に補給され次いで主要分化段階を通じて進まねばならないMSCよりもより速くまた均質に移植部位で軟骨基質を合成するであろう。このような細胞外処置もまた生物活性因子の精製MSCへの均質で制御された適用を提供し、均質な系列委託および分化に導く。内因性生物活性因子の生体内利用は容易に保証され制御できるもの

ではない。ここで開示される前処置段階はこれを回避する。加えて、移植に先立ちMSCを前処置することにより、外因性生物活性因子の全身あるいは局所投与に会合する潜在的に有害な副作用は回避される。この技術のも一つの用途は、移植の時点で細胞が存在する分化の段階に基づく組織再生に指向する能力にある。つまり、軟骨に関連して、移植の細胞の状態は形成される最終組織の型を制御する。

ここで使用されるように、「単糖」という用語は、D-グルコース、D-マンノースおよびD-ガラクトースなどのアルドース、またD-フルクトースなどのケトースである。

ここで使用されるように、「軟骨誘導剤」あるいは「軟骨誘導因子」という用語は、いずれかの天然あるいは合成、有機あるいは無機化合物もしくは生化学化合物あるいは化合物の組合せもしくは混合物、あるいはいずれかの機械もしくは物理的装置、コンテナー、影響、あるいは効力を引用し、それは三次元形態にあるヒト間葉幹細胞に適用することができ、そのためその試験管内誘導あるいは軟骨細胞の生産に作用する。公知の軟骨誘導剤は、例えば、(i) デキサメタゾンなどのグルココルチコイド、(ii) トランスフォーミング成長因子- $\beta$ 上科のメンバー、例えば骨形態形成タンパク質(望ましくはBMP-2あるいはBMP-4)、TGF- $\beta$ 1、インヒビンAあるいは軟骨形成刺激活性因子(CSA)など、(iii) I型コラーゲン(とりわけゲル形態にあるもの)などのコラーゲン性細胞外基質、および(iv) レチノイン酸などのビタミンA類似体などである。

ここで使用されるように、「合成培地」という用語は、この発明の組成物がとりわけこの発明の方法に従って試験管内軟骨形成を受けることができ、また最小必須培地、アスコルビン酸塩あるいはその類似体、鉄源およびインスリンもしくはインスリン状成長因子を含むような維持、成長あるいは培養培地を引用する。

ここで使用されるように、「最小必須培地」という用語は、ヒト間葉幹細胞の生活力を試験管内で支持する公知の組成物のいずれかの無血清細胞動物細胞培養調製物あるいは培地である。その例は、イーグル基本培地、すなわちダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)のいずれか、イスコープ修飾イーグル培地、アル

ファ修飾イーグル培地、またマッコイ5AならびにBGJb(フィットンージャクソン修飾)などである。

ここで使用されるように、「鉄源」という用語は必ずしもそれに限定されないがトランスフェリン、硫酸第一鉄あるいはフェリチンを含む培地に還元、三価鉄形態の鉄を放出するいずれかの種を引用する。

ここで使用されるように、「インスリン」という用語は公知である各種インスリンのいずれかを引用する。インスリンは皮下投与に続く作用の敏速性、持続性および強度に従って3種のカテゴリーに分割される。すなわち前に言及したように、速やか、中間あるいは持続的である。結晶等軸インスリンは塩化亜鉛の存在下の沈殿により調製され、修飾形態は活性のパターンを変更するために発達された。プロタミン亜鉛インスリン(PZI)はインスリンと亜鉛および塩基性タンパク質プロタ

ミンの反応の結果であり、それは溶解し結晶等軸インスリンよりもっとゆるやかに吸収されるが着実な割合での吸収にはもっと信頼性の高いタンパク質複合体を形成する。イソファンは修飾結晶性プロタミン亜鉛インスリンであり、その作用はより少ない部分のプロタミン亜鉛インスリンと量のより多い等軸インスリンの混合物と比較することができる。延長され迅速なインスリン-亜鉛懸濁液もこの発明で使用するために考慮される。インスリンは、例えばヒト、ウシ、ヒツジ、あるいは他の動物起源のものであり得るし、あるいは組換え製品であることもできる。

ヒトイインスリンは今では組換えDNA技術による生産の結果として広く利用することができる。理論としては、それは精製ブタインスリンより僅かではあるが免疫原性が少なく、後者は代ってウシインスリンよりも免疫原性が少ない筈である。ウシインスリンは3個のアミノ酸残基でヒトイインスリンと異なり、一方ブタは $\beta$ 鎖のカルボキシル末端での1個のインスリンでヒトイインスリンと異なる。しかし、高度に精製した時には、3個のインスリンすべては免疫応答を刺激する比較的低いが測定可能な能力を有する。

短期あるいは急速に作用するインスリンは中性pHでの緩衝液に溶解された等

軸結晶亜鉛インスリン（インスリン注射）の単なる溶液である。これらのものは作用の急速な発現を示すが持続性は最も短い。すなわちグルコース水準は20-30分で最低の状態に達し、約2-3時間で基線にまで戻る。

中間作用インスリンはそれが皮下に投与される時よりゆっくり

りと溶解するよう形成される。その作用持続性はかくしてより長くなる。もっとも頻繁に使用される2個の調製品は中性プロタミンハーゲドロン（N P H）インスリン（イソファンインスリン懸濁液）およびレンテインスリン（インスリン亜鉛懸濁液）である。N P Hインスリンはリン酸緩衝液内の亜鉛とプロタミンの複合体でのインスリン懸濁液である。レンテインスリンはインスリンの可溶性を最小化する酢酸塩緩衝液での結晶性（ウルトラレンテ）および無定形（セミレンテ）インスリンの混合物である。これらの調製物は類似の薬物動態プロファイルを有する。

ウルトラレンテインスリン（延伸インスリン亜鉛懸濁液）およびプロタミン亜鉛インスリン懸濁液は長期作用性インスリンである。これらは非常に緩やかな発現と延長（「平坦」）作用頂点を持つ。これらのインスリンは1日中低いインスリン基準濃度を提供するものと主張されている。

ここで使用されるように、インスリンという用語はまたインスリン類似体を含むものと見做される。吸収率を変更したインスリンの最近の発達は関心を惹いている。B 9およびB 27の位置でそれぞれ置換されたアスパラギン酸インスリンおよびグルタミン酸インスリンは殆ど結晶化せず、「モノマー性インスリン」と名付けられている。このインスリンは皮下貯蔵所からより急速に吸収され、かくして食後の必要性に合致する。これに反して、他のインスリン類似体は注射の部位で結晶化する傾向があり、よりゆっくりと吸収される。性能を高められたインスリンがB 10の位置でヒスチジンをアスパラギン酸塩と置換

することにより、またB鎖のカルボキシル末端残基の修飾により生産されている。

この発明の軟骨形成培地の成分の例は表1で示される。

表1

## これらの実験で使用される軟骨形成培地の組成物

成 分	供給業者	菌 株	希 釀	最 終 濃 度
DMEM(高グルコース)	ジコ/BRL	供給通り	なし	純(ニート)
ITS + 著充剤	コラボレイティブ	供給通り	1:99	6.25 $\mu$ g/ml ウシインスリン
テキサメタリン	シグマ	EtOHで1mM	2X1:99	100nM
トランスフォーミング成長	カルハイカム	40 $\mu$ g/ml	1:4000	10ng/ml
アスコルビン酸-2-リン酸	和光	5mg/ml	1:99	5 $\mu$ g/ml
ビルビン酸ナトリウム	ジコ/BRL	100mM	1:99	1mM
プロリン	シグマ	4mg/ml	1:99	40 $\mu$ g/ml
抗生素質 - 抗真菌物質	ジコ/BRL	供給通り	1:99	100U/mlペニシリン

## 実施例 1

高グルコース培地は軟骨形成分化の間に細胞外基質生産を増加する

hMSCsが軟骨形成系列に分化する時、細胞代謝は変更され、また細胞の同化活性が変更される。この一つの現れは細胞外基質生産の増加である。軟骨細胞のユニークな性質の原因となり、また重量支持するのに役立ち、隣接する骨の間の組織を滑らかにさせるのはこの細胞外基質であり、変形性関節症に罹患するのにはこの面である。細胞外基質は、細胞が軟骨細胞に発達するにつれて時間様式で発現されるタンパク質および硫酸化

プロテオグリカンで構成される。タンパク質およびプロテオグリカンはアグレカン、軟骨オリゴマトリクスタンパク質(COMP)、ヒアルロン酸、硫酸ケラタン、鎖状タンパク質およびII型コラーゲン同じく他のものを含む。これらの分子は細胞外で組立てられ、細胞体を取り囲む。

軟骨形成分化を受けるペレット培養でのhMSCsは前に言及した細胞外基質プロテオグリカンを発現する。この開示において、グルコース4.5g/lを含む培地がより大きな細胞生活力および示されるような細胞外基質成分のより大き

な生産を産み出すことを我々は示す。図1において、細胞ペレットのサイズの増加は培地が「高グルコース」である時に明白である。hMSCペレットのサイズの変化は細胞外基質の合成の範囲を反映する。各ペレットは200,000細胞のアリコートをグルコース1g/l (5.5 mM) (左側) あるいはグルコース4.5g/l (25 mM) (右側) を持つ軟骨形成培地1/2 mlに移すことにより形成された。軟骨形成培地は、前述の濃度のグルコースを持つDMEMおよび以下の補充剤：デキサメタゾン100 nM、トランスフォーミング成長因子 $\beta$  10 ng/ml、ピルビン酸ナトリウム1 mM、アスコルビン酸-2-リン酸5  $\mu$ g/ml、およびプロリン40  $\mu$ g/mlよりなる。「ITS+」の1:99希釈液はウシインスリン6.25  $\mu$ g/ml、トランスフェリン6.25  $\mu$ g/ml、亜セレン酸6.25  $\mu$ g/ml、リノール酸5.33  $\mu$ g/ml、およびウシ血清アルブミン1.25 mg/mlを供給した。ペニシリン100 U/ml、ストレプトマイシン100  $\mu$ g/ml、

およびアンホテリシンB 250 ng/mlが濃縮抗生物質溶液の1:99希釈液で供給された。

細胞および培地は15 mlポリプロピレン円錐底部遠心管に挿入され、ゆっくり遠心分離 (500 x g、5分) され、その後緩いキャップを持つ管は5%加湿CO<sub>2</sub>恒温器に37°Cで置かれた。続く12時間にわたり、管底部にある細胞は約1 mmの直径を持つ球状ペレットに自己を再組織化した。

「ペレット培養物」は細胞に新鮮培地を供給することで維持された。1週に3回、培地は管から吸引され、新鮮培地0.5 mlが付加された。管はゆるやかに振動されペレットが自由に浮遊し管の側壁に付着しないようにされた。図1に関連して、ペレットは固定され、2週間の成長の後、食塩加リン酸緩衝液にパラホルムアルデヒド4%に60分置かれ、包埋および凍結に先立ち撮影された。グルコース1g/lを持つ軟骨形成培地でhMSCsにより形成されたペレットは直径0.8 mmである(左側)。グルコース4.5g/lで培養されたペレットは1.6 mmの直径を持つ(右側)。グルコース4.5g/lを含む培地でのhMSCのサイズの増加は細胞増殖の増加によるよりもむしろ、生産される大量の細

胞外基質によるものである。最終倍率、40X。異なった軟骨形成条件を検討するため、細胞ペレットは固定され、5-8ミクロンで切開され、組織染色および免疫組織染色を受けた。

図2で示されるように、軟骨に特徴的なII型コラーゲンの発現の開始は高グルコース培地4.5g/1を含む軟骨形成培地で培養された細胞で1週と同じだけより進められた。例えば、

hMSCsは、グルコース1g/1を持つ軟骨形成で培養の第1週後にこのタンパク質の発現の証拠を殆ど示さなかった(図2A)。これとは逆に、II型コラーゲン合成の開始はグルコース4.5g/1を持つ軟骨形成培地で成長するペレット内で容易に検出された(図2B)。2週時の点で、II型コラーゲンはグルコース1g/1を持つ培地で成長するペレットの限定領域で存在した(図3A)が、一方II型コラーゲン合成の証拠はグルコース4.5g/1で成長したペレット全体で明らかに検出された(図3B)。

硫酸プロテオグリカンの高い濃度のものを持つ細胞外基質の形成はサフラニンO(示されていない)およびトルイジンブルーOでの染色により示された。トルイジンブルーOでの染色時に、軟骨性細胞外基質を持つペレットの切片はブルーの色よりも紫がかかった色の異染色性を示し、これは軟骨で見出される前に言及されたような負に負荷された基質要素の存在を示している。グルコース1g/1を持つ軟骨形成培地でのhMSCペレットが切開され染色された時に2週の培養後にこの紫がかかった異染色性染色の証拠を一方では示したが(図4A)、この染色の範囲は培養がグルコース4.5g/1を含んだ時により一層顕著であった(図4B)。

### 実施例2

#### 高グルコースは軟骨形成の間にhMSC生活力を増加する

グルコース4.5g/1を含む培地で培養されたhMSCsの軟骨形成分化の改善に関しては可能な数多くの説明がある。しかし、この実施例は、この高グルコース培地がグルコース

1 g／lを持つ培地がなすよりももっと大きな範囲で細胞生存を促進することを示す。高生活力はより大きな軟骨形成に帰着するが、それは単により大きな数の生活細胞が軟骨性細胞外基質成分を分泌できるからである。加えて、細胞生存のより大きな水準はもっと強壮な細胞集団を表しているように見え、ここでは各生存細胞はその近辺により多くの細胞外基質タンパク質、プロテオグリカン、および炭水化物を加えることに寄与する。軟骨が無血管の器官であるために、培養培地で糖類の比較的高い濃度というこの必要性は生体内での軟骨細胞の異常な代謝特性を表している。

ペレット培養における hMSCs の生活力は、器官培養における細胞の生存を検証するためにプール他により開発された色素排除試験を修飾することにより検定された (C. A. プール、N. H. ブルックス、R. T. ギルバート、B. W. ポーモント、A. クローザー、L. スコット、および M. J. メリリーズ。「固定可能フルオロプローブ・5-クロロメチルフルオレセイン・ジアセテートおよびエチジウム・ホモ二量体-1を使用する結合組織体外移植組織での生活能および非生活能細胞の検出」結合組織研究、33巻、233-241ページ、1996年)。ペレット収穫の72時間前に、エチジウムホモ二量体色素 (DMSO 内での菌株 1 mM) が 2  $\mu$ M の最終濃度になるように培地に加えられた。ペレットは次いで標準保温条件に戻された。収穫に際し、ペレットは食塩加リン酸緩衝液で 4 × 30 分すすぐれ、次いで 1 時間パラホルムアルデヒド 4 % で固定され、凍結切片包埋液で包埋され、液体窒素浴で冷却さ

れ、また凍結切開された。8  $\mu$ m 切片は水様装備および蛍光顕微鏡検査による観察に先立ち、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) 500 n g／ml で対比染色剤着色された。

エチジウムホモ二量体色素保温のこれらの条件下で、無傷原形質膜のない細胞のみがその核に色素の入場を許した。これらの核は 490 nm 光で励起されると赤く蛍光発光する。青色に蛍光発光する DAPI (1  $\mu$ g／ml) を持つ固定切片の保温はこの第2色素の他のすべての核の DNA への挿入を可能にし、ここではらせん間結合部位はエチジウムホモ二量体で占められることはない。かくして

エチジウムホモ二量体保溫および固定の時点で生活能である細胞の核は赤く輝き、一方エピ螢光顕微鏡写真による観察下では生活能細胞は青く輝く。

エチジウム・ホモ二量体-処置ペレットの試験は非生活能細胞の赤色核がグルコース $1\text{ g}/1$ で成長したペレットで顕著であることを明らかにする(図5A)。これとは著しく対照的に、グルコース $4.5\text{ g}/1$ で成長した同等のペレットは赤色核を殆ど含まない(図5B)。

### 実施例3

#### TGF- $\beta$ 3はMSCsにとって優れた軟骨形成剤である

ここで報告される実験は比較的大きな数のラビット(約16匹)からのMSCsの軟骨形成を各種の条件の下で調査したものである。

TGF- $\beta$ 1は軟骨形成の有力なプロモーターであるとして長い間公知であった(加藤[2]による実施例検討を参照され

たい。)。事実TGF- $\beta$ 1は例えばオドリスコル[3]のそのように数多くの研究で軟骨の修復を実行するために移植片で使用されており、そこでは間葉始原の組織(例えば骨膜および筋など)に軟骨形成を導入することが示された。更にTGF- $\beta$ 1を骨軟骨移植片に使用する他の報告も存在する[4, 5]。最近ブライアン・ジョンストンは、TGF- $\beta$ 1が、ペレット培養で一次細胞に付加される時には、粘稠性の欠陥という問題を克服し、より再生可能な結果に導いた。これは重要な発展であり、最初の発見を強化した。

TGF- $\beta$ 3は子宮平滑筋腫細胞に際立った効果を持つものとして発見された[6]。平滑筋腫は低い有糸分裂指数で肥大性細胞による大量の細胞外基質の形成により特徴付けられる良性平滑筋腫瘍である。軟骨表現型を示す平滑筋腫の少くとも1件の報告事例がある。これらの観察に基づいて、我々は間葉幹細胞の軟骨形成分化に対するTGF- $\beta$ 3の作用を調査した。

ヒト骨髓誘導間葉幹細胞は密集になるまでFBS 10%の存在下で標準条件の下で培養された。細胞はトリプシン消化され、軟骨形成培地で2回洗浄され、TGF- $\beta$ 1、 $10\text{ ng}/\text{ml}$ 、TGF- $\beta$ 3、 $10\text{ ng}/\text{ml}$ のいずれかを含みあるいはそのいずれをも含まない軟骨形成培地で $15\text{ ml}$ ポリプロピレン管内で

200,000細胞/m<sup>2</sup>の密度で再懸濁された。細胞は層形成のため回転され、培地は3-4日毎に取り替えられ、細胞は7日、14日および21日に収穫された。凍結切片(8 μm)はトルイジンブルーで染色された。それらはまた、免疫細胞化学プロトコルを用いる下記のもの：II型コラーゲン

ン、I型コラーゲン、および軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)で染色された。

同じ供与体からの細胞がTGF-β1あるいはTGF-β3よりもしくはなしで軟骨形成培地で培養された。ゼロ日(すなわち層形成のために細胞を回転する前に)I型コラーゲンの発現が細胞に近接して観察されたが、II型コラーゲンおよびCOMPの染色はなかった。成長因子付加の不在下でペレット培養8日後に、COMP発現は細胞外基質で豊富であったが、II型コラーゲンは明白でなかった。TGF-β1の存在下で、II型コラーゲンの発現は同じくなかった。TGF-β3の存在でペレットの小領域が無細胞となりある細胞はII型コラーゲンを発現した。14日目に、II型コラーゲンの局所発現で見られるように、TGF-β1の存在下でいくつかの軟骨形成分化の証拠があった。しかしTGF-β3の存在下で成長した時には、ペレットは劇的に異なった様相を示した。この場合ペレットは豊富な細胞外基質の存在のためにサイズがより大きくなった。細胞の大部分は肥大性であり、細胞が未だに未分化であった中心区域を除いて全体にII型コラーゲンの発現があった。ペレットの周辺を囲んで、細胞は軟骨膜に類似したII型の強度の染色を持つ細長い形状を採用した。

TGF-β1の存在下で培養21日後に、周辺は陰性であったがそれを除きペレット全体にわたり染色があった。TGF-β3では、非常に強い染色、とりわけテリトリー間基質にそれが見られた。COMPでの染色も同様で、ただ周辺細胞染色は少なくテリトリー間染色は増加した。

これはTGF-β3が試験管内ヒトMSCsの軟骨形成分化に劇的な作用を有し、また豊富な軟骨状細胞外基質の発達を刺激することを示す。培養21日後、組織は関節軟骨に類似する形態を持つ。テリトリー間基質でのCOMPの特異的

な発現は特に成熟軟骨を想起させる。加えてII型コラーゲンの豊富な発現は、これらの細胞が軟骨形成系列に分化したことを示唆している。その作用はTGF- $\beta$ 1に比べてTGF- $\beta$ 3の存在下でより際立っている。

#### 実施例4

##### ペレット培養実験

###### hMSC付着培養

ヒト間葉幹細胞は（ブルーダー他、1997年）広範な継代培養および続く冷凍保存の間での精製ヒト間葉幹細胞の成長動態、自己再生および骨形成能。細胞生化学ジャーナル、64巻：278-294ページ、1997年、に記載された通り分離され、培養拡張され、付着細胞として生育された。成長培地はダルベッコ修飾イーグル培地（D MEM）であり、グルコース1g/lを含み、選択されたロットからの胎仔ウシ血清で補充されていた（レノン他、1996年）S. E. ヘインズワース、S. P. ブルーダー、N. ジェイズウォール、およびA. I. キャプラン。骨髄からのヒトおよび動物間葉始原細胞：最適選択および増殖のための血清の同定。試験管内細胞発展生物学-動物篇32巻：602-611ページ：1996年。およびペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100mg/ml、ならびにアンホテリシンB 250ng/ml）。細胞

は5%炭酸ガス雰囲気で37°Cで成長した。細胞は約13集団倍加に対応する継代1で使用された（ブルーダー他、1997年）。広範な継代培養および続く冷凍保存の間での精製ヒト間葉幹細胞の成長動態、自己再生および骨形成能。細胞生化学ジャーナル、64巻：278-294ページ、1997年。

###### hMSCペレット培養

軟骨形成はhMSCsを稠密三次元培養形態に切り替えることで促進され、そのため250,000細胞が約1mm当初直径の球状ペレットを形成した。これらのペレットを形成するために、付着hMSCsはトリプシン消化され、血清含有培地で洗浄され、次いで標準組織培養技術を使用して無血清軟骨形成培地で再懸濁された。この培地はオシリス・プロビジョナル・アプリケーション#640100-129に記載された通りであった〔トランスフォーミング成長因子ベー

ター3、10 ng/ml (TGF- $\beta$ 3、オンコジーン・リサーチ・プロダクツ、マサチューセッツ、ケンブリッジ)、デキサメタゾン100 nM (シグマ、ミズーリ、セントルイス)、アスコルビン酸-2-リン酸50  $\mu$ g/ml (和光薬品株式会社、日本、東京)、ピルビン酸ナトリウム100  $\mu$ g/ml、プロリン40  $\mu$ g/ml、およびウシインスリン6.25  $\mu$ g/ml、トランスフェリン6.25  $\mu$ g/ml、亜セレン酸6.25  $\mu$ g/ml、リノール酸5.33  $\mu$ g/ml、ウシ血清アルブミン1.25 mg/ml (ITS-プラス、コラボレイティブ・バイオメディカル・プロダクツ、マサチューセッツ、ケンブリッジ)で補充された高グルコースDEMEM]。

hMSCsの軟骨形成ペレットは下記の方法で生産された。無血清軟骨形成培地0.5 mlに懸濁された250,000細胞のアリコートが15 ml円錐形ボリプロピレン遠心管 (VWR) に分配された。細胞は5分600 x gで遠心分離され、管の底部に残された。管はガス交換を可能にするためゆるめられたキャップ付きの恒温器に置かれた。沈殿細胞は24時間以内に管の底部で球状ペレットを形成した。培地は週3回交換され、細胞は4週までこの方法で培養された。

#### 肥大の誘導

肥大分化はペレットが標準軟骨形成条件の下で7日あるいは14日培養された後に誘導された。その時点において、軟骨形成培地はチロキシン (シグマ) 50 ng/mlを含む成熟培地で置換された。肥大を更に誘導するために、デキサメタゾンの濃度は10<sup>-9</sup> Mに下げられ (クアトロ他、1992年)、また $\beta$ -リン酸グリセロール20 mMが加えられた (デュードンヌ他、1994年)。C. M. シーマインズ、S. W. ゴーエイ、S. ブーキセビッチ、J. K. ヌーランド、T. K. サンバス、M. ヘルダー、およびE. H. バーガー。骨形成タンパク質およびトランスフォーミング成長因子- $\beta$ の培養された長骨原基痕跡での軟骨形成への逆作用。骨無機質研究ジャーナル9巻：771-780ページ、1994年。

他の予備実験は、T3およびチロキシンがいずれも肥大を誘導するのに有効であることを示している。レチノール酸およびその誘導体などの薬剤はまたこの方

法で有効である。

ペレットの分析

細胞ペレットはP B S 内でのパラホルムアルデヒド4 %で1時間固定により収穫された。サンプルは次いでエタノール70 %に移され、エタノールおよびキシレンシリーズで脱水され、パラフィン包埋された。5  $\mu$ m切片は各ペレットの中心を通して切断された。

単一特異性抗体が軟骨形成分化の細胞外基質タンパク質特性を検出するために使用された。切片はp H 7. 6 のトリス-酢酸100 mM、ウシ血清アルブミン0. 1 %をコンドロイチナーゼA B C (生化学、アメリカ、メリーランド、アイジャムズビル) 50 mU/mで30分消化された。II型コラーゲンは2 mg/mで使用されたマウスモノクローナル抗体C 4 F 6 で同定された (スリニバス他、1993年)。スリニバス、G. R. 、H. J. バラック、およびC. O. チェスター。II型コラーゲンおよびその臭化シアンペプチドの定量免疫検定。免疫学方法論ジャーナル159巻: 53-62ページ、1993年。X型およびIX型コラーゲンはそれぞれペプシン消化後マウスモノクローナルX 53で同定された (カルテット、ドイツ連邦共和国、ベルリン) (ギルコンタイテ他、1996年) S. フリッシュホルツ、P. ラミ、K. ワグナー、B. スボボダ、T. アイグナーおよびK. フォン・デア・マルク。モノクローナル抗体を持つ正常胎児および成人変形性関節症軟骨におけるX型コラーゲンの免疫局在化。基質生物学15巻: 231-238、1996年、および $\alpha$  C I X (C. O. チェスター他、原稿作成中) コンドロイチナーゼ処置に先立ち切片は酢酸0. 5 M 内でのペプシン (シグマ) 2 mg/mで1時間22

℃で保温された。

すべての免疫染色に対し、反応性が製造業者の使用説明書 (カーグード・アンド・ペリー・ラブス、メリーランド、ゲイザーズバーグ) に基づきビオチン化ヤギ抗マウスあるいは抗ラビット抗体で切片を連続保温し、次いでストレプトアビジン・ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼで標識されて検出された。3,

3' -ジアミノベンジジン (DAB) およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のペルオキシダーゼ反応製品として信号が開発された。

陰イオン硫酸プロテオグリカンはサフラニンO染色およびトルイジンブルー異染色性により検出された。これらの染色は軟骨基質の付着を特徴付ける (シーハンおよびフラップチャック、1980年)。シーハン、D. C. およびB. B. フラップチャック。組織化学の理論と実践、第2版、バッテル・プレス、オハイオ、コロンバス、481ページ、1980年。

#### 実施例5

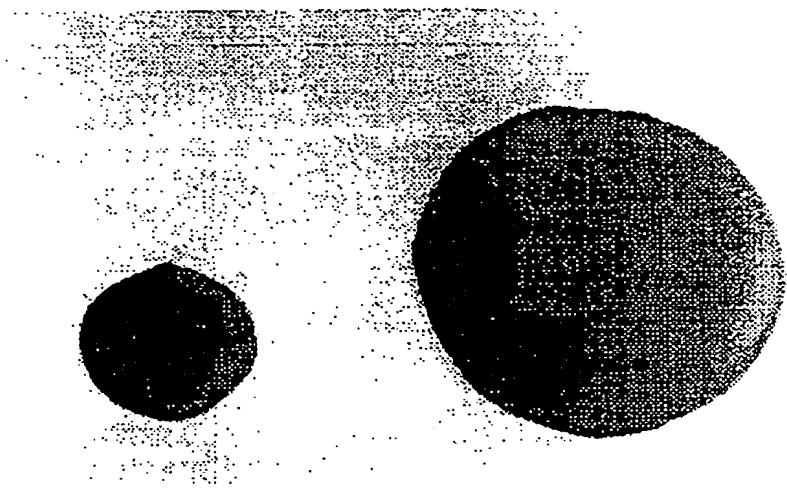
##### 2種の培地でのペレット培養におけるhMSCsの連続処置は肥大を誘導する

軟骨形成分化を受けるヒトMSCsは遺伝子発現の内部プログラムに起因するかもしれない環境条件に応答するかのいずれかで肥大細胞に成熟することができる。肥大を誘導するために、試験管内培養条件は軟骨形成分化の2週後に変更された。TGF- $\beta$ 3の引出し (セーラ他、1997年)、ジョンソン、E. H. フィルバロフ、J. ラボード、D. M. シーハン、R. デリンク、およびH. L. モーゼス。マウス骨格組織の切

形キナーゼ欠損TGF- $\beta$ II型レセプターの発現は末端軟骨細胞分化および変形性関節症を促進する。細胞生物学ジャーナル、139巻：541-552ページ。およびチロキシン50nMの追加 (バロックおよびレッディ、1994年)。チロキシンは合成培地で分離軟骨細胞からの柱状軟骨の形態形成を調節する血清因子である。細胞生物学ジャーナル126巻：1311-18ページ、1994年。培地に対し培養の2週追加後際立った肥大効果を与えた。肥大はこれらの条件が $\beta$ -リン酸グリセロール20mMの追加およびデキサメタゾン濃度の10<sup>-9</sup> Mまでの減少を組合せた時にはより顕著であった。これらのペレットは広範な細胞周辺でのECMの堆積で囲まれた肥大細胞の領域を含んでいた (図2)。28日間標準軟骨形成分培地で維持されたペレットと比較すると、処置されたペレットはII型およびIX型コラーゲンの強い染色、ならびに抗体X53で検出されたX型コラーゲンの付着で不均整ではあるが著しい増加を示していた (図2)。

【図1】

F | G. |



【図2】

FIG. 2A

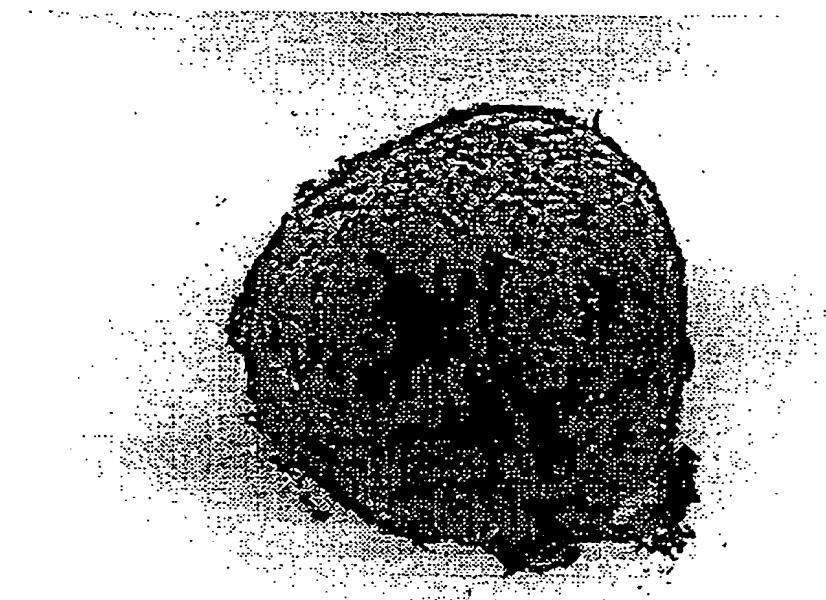


FIG. 2B



【図3】

FIG. 3A

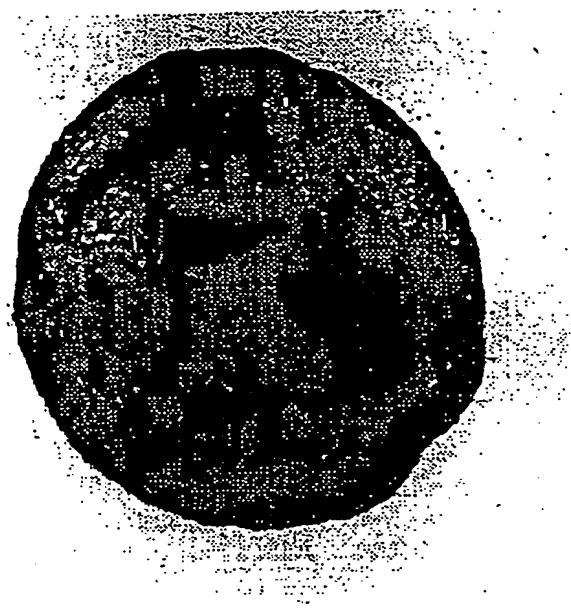


FIG. 3B



【図4】

FIG. 4A

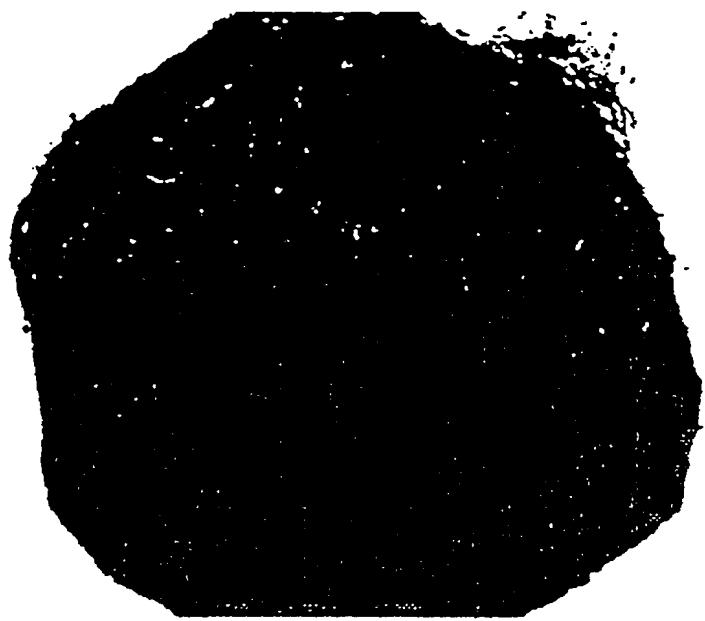
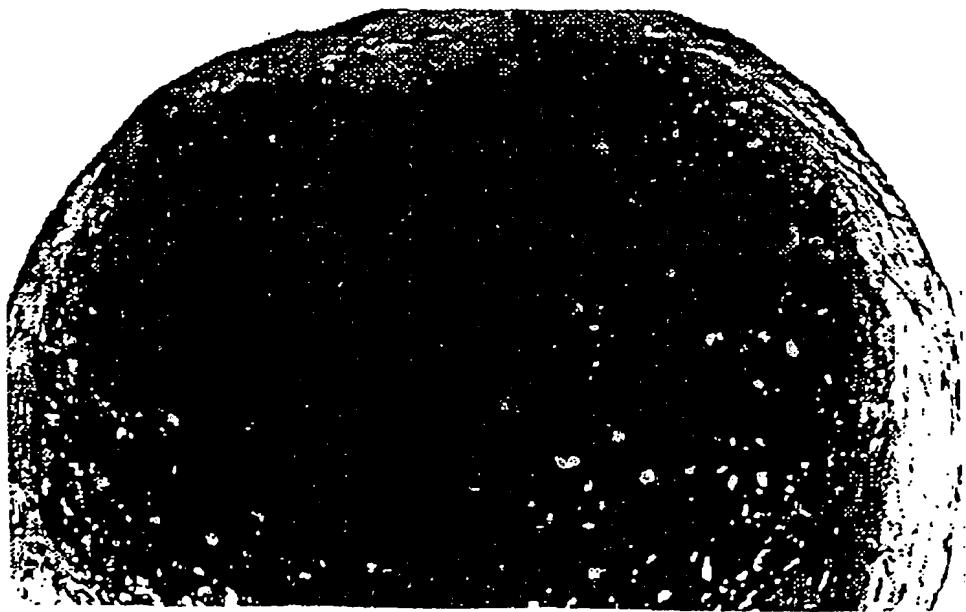


FIG. 4B



【図5】

FIG. 5A

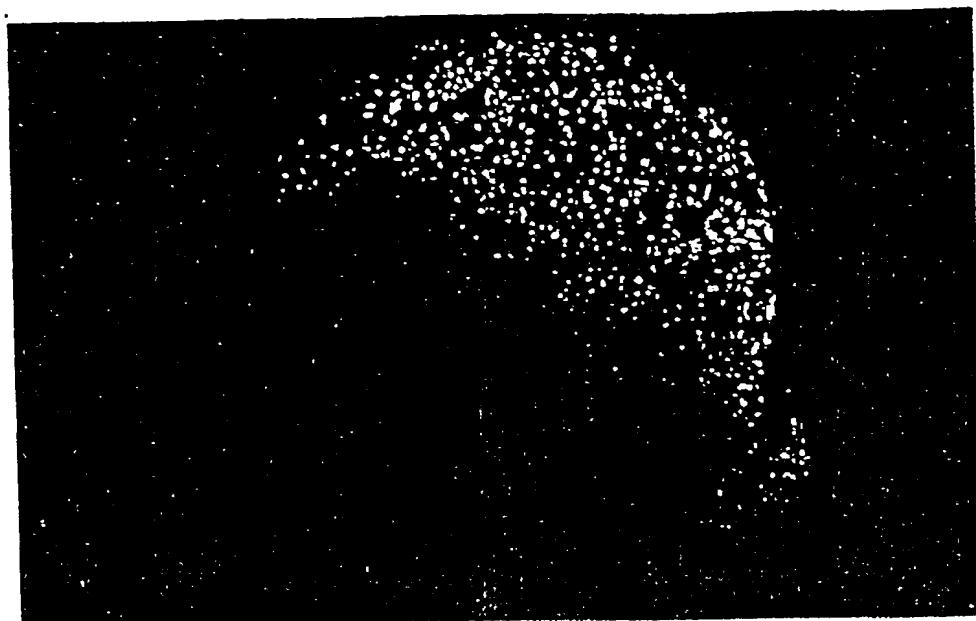
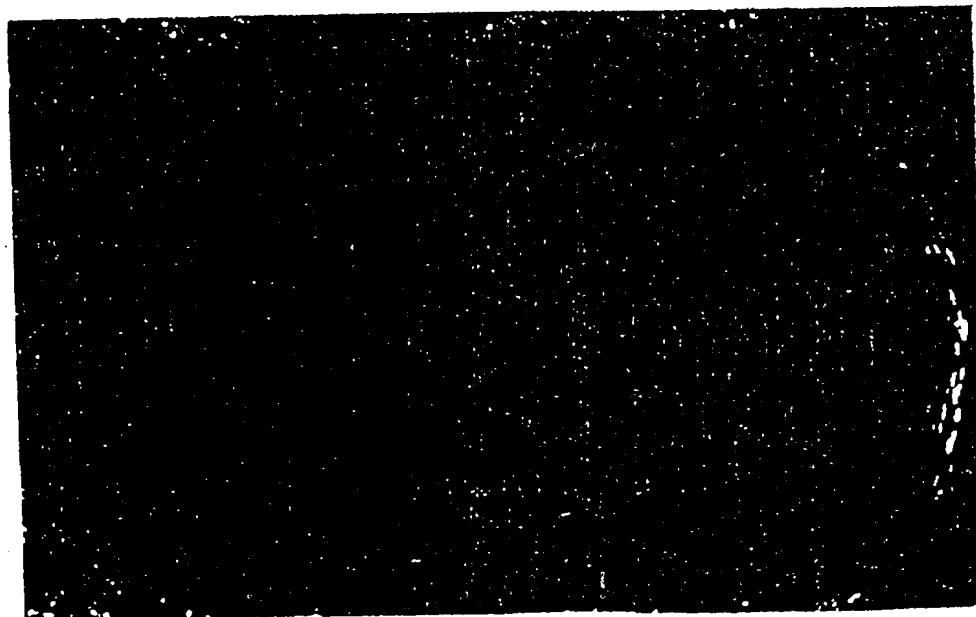
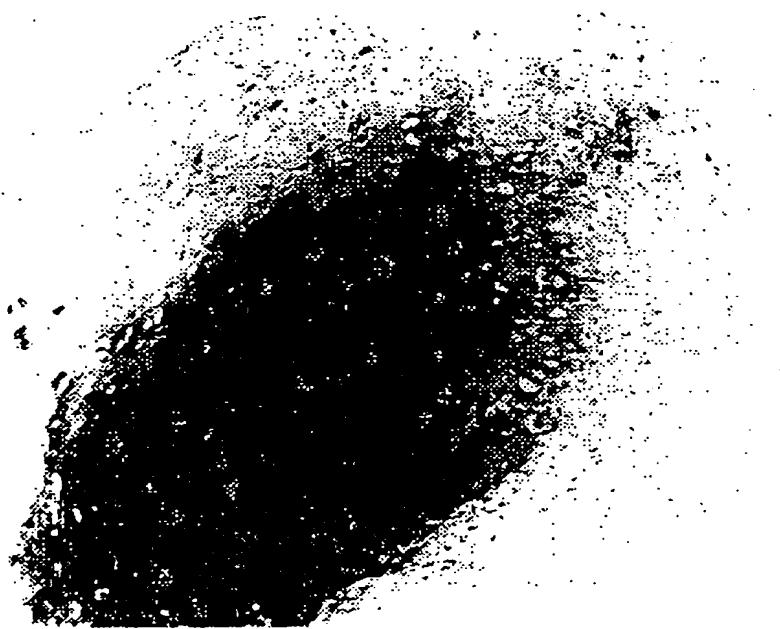


FIG. 5B



【図6】

FIG. 6



【図7】

FIG. 7A

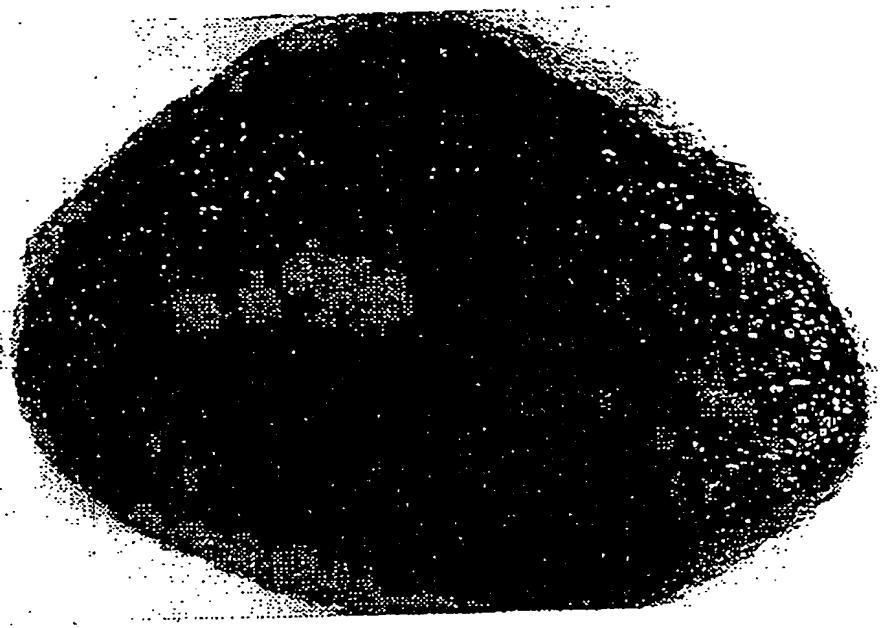
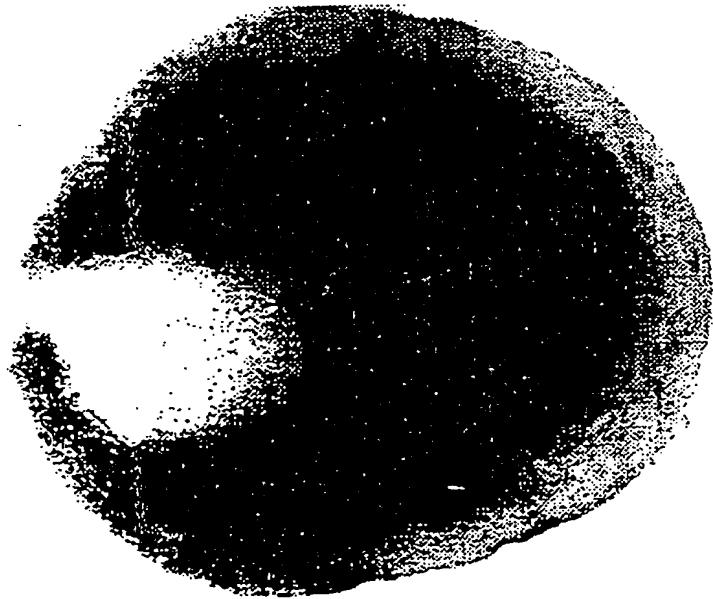


FIG. 7B



【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年12月16日(1998.12.16)

【補正内容】

請求の範囲

32. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで接触の段階がヒト間葉幹細胞のペレットを合成無血清培地で培養することを含むことを特徴とするプロセス。

33. 請求の範囲第32項に記載のプロセスであって、ここで合成無血清培地が(1)合成最小必須培地、(2)アスコルビン酸塩あるいはその類似体、(3)鉄源、(4)インスリンあるいはインスリン状成長因子、および(5)少くとも1個の軟骨誘導剤あるいは因子、を含むことを特徴とするプロセス。

34. 請求の範囲第25項に記載の方法であって、ここで細胞が軟骨誘導組成物で培養されその後硬質多孔容器に置かれることを特徴とする方法。

35. 請求の範囲第34項に記載の方法であって、ここで硬質多孔容器がセラミックキューブであることを特徴とする方法。

36. 請求の範囲第1項に記載の組成物であって、ここで軟骨誘導剤がTGF- $\beta$ 3であることを特徴とする組成物。

37. 請求の範囲第14項に記載のプロセスであって、ここで軟骨誘導剤がTGF- $\beta$ 3であることを特徴とするプロセス。

38. 請求の範囲第25項に記載のプロセスであって、ここで軟骨誘導剤がTGF- $\beta$ 3であることを特徴とするプロセス。

## [国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US97/22022												
<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>            IPC(6) A01N 1/02; A61K 35/28            US CL 435/372, 395, 405; 424/93.21, 93.7, 572            According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b>            Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)            U.S. 435/372, 395, 405; 424/93.21, 93.7, 572</p>														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.														
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">KADIYALA, S. et al. Culture Expanded Canine Mesenchymal Stem Cells Possess Osteochondrogenic Potential in vivo and in vitro. Cell Transplant. 09 May 1997, Vol. 6, No. 2, pages 125-134, see entire document.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-35</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">GRIGORIADIS, A. E. et al. Differentiation of Muscle, Fat, Cartilage, and Bone from Progenitor Cells Present in a Bone-derived Clonal Cell Population: Effect of Dexamethasone. J. Cell Biol. June 1988, Vol. 106, pages 2139-2152, see entire document.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-35</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">QUARTO, R. et al. Modulation of Commitment, Proliferation, and Differentiation of Chondrogenic Cells in Defined Culture Medium. Endocrinology. 1997, Vol. 138, No. 11, pages 4966-4976, see entire document.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-35</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	KADIYALA, S. et al. Culture Expanded Canine Mesenchymal Stem Cells Possess Osteochondrogenic Potential in vivo and in vitro. Cell Transplant. 09 May 1997, Vol. 6, No. 2, pages 125-134, see entire document.	1-35	Y	GRIGORIADIS, A. E. et al. Differentiation of Muscle, Fat, Cartilage, and Bone from Progenitor Cells Present in a Bone-derived Clonal Cell Population: Effect of Dexamethasone. J. Cell Biol. June 1988, Vol. 106, pages 2139-2152, see entire document.	1-35	Y	QUARTO, R. et al. Modulation of Commitment, Proliferation, and Differentiation of Chondrogenic Cells in Defined Culture Medium. Endocrinology. 1997, Vol. 138, No. 11, pages 4966-4976, see entire document.	1-35
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	KADIYALA, S. et al. Culture Expanded Canine Mesenchymal Stem Cells Possess Osteochondrogenic Potential in vivo and in vitro. Cell Transplant. 09 May 1997, Vol. 6, No. 2, pages 125-134, see entire document.	1-35												
Y	GRIGORIADIS, A. E. et al. Differentiation of Muscle, Fat, Cartilage, and Bone from Progenitor Cells Present in a Bone-derived Clonal Cell Population: Effect of Dexamethasone. J. Cell Biol. June 1988, Vol. 106, pages 2139-2152, see entire document.	1-35												
Y	QUARTO, R. et al. Modulation of Commitment, Proliferation, and Differentiation of Chondrogenic Cells in Defined Culture Medium. Endocrinology. 1997, Vol. 138, No. 11, pages 4966-4976, see entire document.	1-35												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; vertical-align: top; padding: 2px;">           Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "B" earlier document published on or after the international filing date which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width: 10%; vertical-align: top; padding: 2px;">           "T"            later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention         </td> <td style="width: 60%; vertical-align: top; padding: 2px;">           "X"            document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y"            document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "Z"            document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family									
Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family												
Date of the actual completion of the international search 26 FEBRUARY 1998		Date of mailing of the international search report 10 APR 1998												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer MARY TUNG Telephone No. (703) 308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US97/22022
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMAGUCHI, A. Regulation of Differentiation Pathway of Skeletal Mesenchymal Cells in Cell Lines by Transforming Growth Factor- $\beta$ Superfamily. Sem. In Cell Biol. 1995, Vol. 6, pages 165-173, see entire document.	1-35
Y	YOUNG, H. E. et al. Pluripotent Mesenchymal Stem Cells Reside Within Avian Connective Tissue Matrices. In Vitro Cell. Dev. Biol. September 1993, Vol. 29A, pages 723-736, see entire document.	1-35
Y	US 5,486,359 A (CAPLAN et al) 23 January 1996, see entire document.	1-35
Y	US 5,226,914 A (CAPLAN et al) 13 July 1993, see entire document.	1-35
Y	US 5,466,572 A (SASAKI et al) 14 November 1995, columns 2 and 3.	1-22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US97/22022

## B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, JAPIO, PATOSWO, PATOSEP  
search terms: chondrogenesis, chondroinduction, chondrocyte, mesenchymal cell, stromal cell, stem cell, precursor cell, progenitor cell, growth factor, stimulating factor, chondroinductive factor, glucocorticoid, TGF-beta, BMP-4, bone morphogenic factor, vitamin A, retinoic acid, Retin-A, ascorbic acid, vitamin C, insulin, dexamethasone.

---

フロントページの続き

(72)発明者 マーフィー, ジェイ. , メアリ  
アメリカ合衆国(住所表記なし)

(72)発明者 バリー, フランシス, ビー.  
アメリカ合衆国, 21207 メリーランド,  
ボルチモア, ビックウィック ロード  
2510